

博士論文審査報告書

氏名	Mahfuza Akter (マフザ アクター)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	論博理第 19 号
学位授与報告番号	乙第 56 号
学位授与年月日	平成 28 年 12 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 2 項該当
論文題目	Structural Chemistry of Multi-Copper Oxidase 「マルチ銅酸化酵素の構造化学」
論文審査委員	(主査) 教授 城 宜嗣 (副査) 教授 樋口 芳樹 (副査) 教授 西谷 秀男 (副査) 教授 栗栖 源嗣 (大阪大学蛋白質研究所) (副査) 准教授 柴田 直樹

1. 論文内容の要旨

マルチ銅酸化酵素は、分子内に 3 種類 (タイプ I, II, III) の銅原子を 4 個有するタンパク質である。本酵素は、タイプ I 銅部位で様々な基質を酸化し、その還元力を使ってタイプ II 銅およびタイプ III 銅部位で酸素を水にまで 4 電子還元する。本研究では、マルチ銅酸化酵素の触媒反応機構およびプロトン経路を明らかにすることを目的に 2 種類の酵素の構造化学的研究を進めた。大腸菌由来の Cue0 については、中性子結晶構造解析を目指して完全重水素化試料を調製した。*Myrothecium verrucaria* 由来のビリルビン酸化酵素 (BOD) については、野生型と変異体酵素の X 線結晶構造解析を行った。

旧来の Cue0 発現系を用いて重水素化培地でタンパク質を発現させたところ、シグナルペプチドが不均一に残り、良質の単結晶を得ることができなかった。そこで、シグナルペプチドの直後に HRV3C プロテアーゼ切断部位を挿入した新しい発現系を構築することにより当該部位を確実に削除した均一な試料の調製に成功した。質量分析の結果、本試料中の水素原子は、ほぼ 100% 重水素原子に置換されていた。本試料を結晶化して X 線解析を行ったところ、分子全体構造も 3 種類の銅原子結合部位も従来の酵素と同一であった。可視・紫外の吸収スペクトルの結果もそれを支持しており、本試料は中性子結晶解析に適した試料であると判定された。今後、さらに良質で大きな結晶を得られる条件を探索している。

野生型 BOD 酵素については 1.46 Å 分解能の結晶構造解析に成功した。さらに、タイプ I 銅の配位子の一つメチオニンをグルタミンに置換 (M506Q) することにより基質の特異性を変化させた変異体についても 1.43 Å 分解能の結晶解析に成功した。これより、M506Q 変異体の基質特異性や酸化還元電位の変化は、タイプ I 銅への配位子構造の変化が原因であることを提案した。また、野生型では、タイプ I 銅の他の配位子 His437 側鎖の Nε2 原子が近傍 Trp435 の Cδ1 原子と共有結合をつくるが、M506Q 変異体ではその結合が形成されていないことを見出した。

2. 論文審査結果

本研究は、X 線結晶解析法および中性子結晶解析法を用いて、マルチ銅酸化酵素の触媒反応機構、基質特異性およびプロトン経路を明らかにすることを最終目的としている。申請者は、2 種類のマルチ銅酸化酵素について構造化学的研究を進めた。

大腸菌由来の Cue0 については、中性子結晶構造解析により X 線還元の影響を受けない分子構造を得ることを目指して、タンパク質中の全水素原子を重水素原子に置換した完全重水素化試料を調製した。従来の発現系から調製した重水素置換体試料は分子中にシグナルペプチドを不均一に有しており、それが原因で高分解能の X 線回折データを示す良質の結晶が得られなかった。そこで申請者は、シグナルペプチドを確実に削除できるように HRV3C プロテアーゼ切断部位を挿入した新しい発現系を構築し、従来よりも均一な重水素化 Cue0 試料の調製に成功した。得られた試料を結晶化して X 線解析をしたところ、分子構造は従来酵素の構造と差異はなく、本試料は今後中性子結晶解析を遂行する目的に合致したものであることを証明した。現在、中性子回折実験に適する結晶の調製を進めている。

Myrothecium verrucaria 由来のビリルビン酸化酵素 (BOD) は、これまでに 2 つの野生型酵素の X 線結晶構造が報告されていた。しかし、両者とも解析分解能が低く、また触媒反応機構解明に重要な部位の構造が同定できていなかった。そこで、野生型と基質特異性を変化させた M506Q 変異体酵素について、高分解能・高精度の X 線結晶解析を遂行した。得られた構造から、M506Q 変異体の基質特異性や酸化還元電位の違いは、タイプ I 銅への配位子構造の変化が原因であることを提案した。また、野生型ではタイプ I 銅の他の配位子 His437 の Nε2 原子が近傍 Trp435 の Cδ1 原子と共有結合をつくるが、M506Q 変異体ではその結合が形成されていないことを見出した。

Cue0 酵素についての本研究は、今後中性子結晶構造解析への道を拓いたものと評価でき、これは触媒反応機構およびプロトン経路の解明を可能とするという観点から極めて重要である。また、BOD についての結果は、酵素の特異性を制御する取組に重要な知見を与える。本研究の進展は、当該研究分野の基礎研究の発展に加えて、新規の人工酵素の開発・応用等に大いに寄与するものと期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 28 年 10 月 12 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。